非限制性核酸内切酶 *S*ma 的表达纯化工艺及性能研究

徐一帆，刘明秋*

（复旦大学生命科学学院上海 200438）

摘要：

[目的]大量表达非限制性核酸内切酶*S*ma并获得高纯度目的蛋白,并对其酶活进行鉴定。[方法]PCR 获得 *S*ma 基因片段，构建 pET28a-ompA-*S*ma 表达载体，转入 *E. coli* BL21(DE3)中，筛选出不同培养基下，目的蛋白可溶表达量最高的条件。通过渗透休克方法提取目的蛋白，并经离子交换纯化。检测不同的温度条件下 *S*ma 的酶活，并与商品化产品进行比较。[结果]经 PCR 和测序证明重组蛋白表达质粒构建正确。可溶蛋白产量为 7mg/L，每 L 培养基获得 7300KU 的 *S*ma, 纯化后纯度>95%，活性达 273U/μl,(商品化产品为 250U/μl)。 [结论]成功地表达了可溶性非限制性核酸内切酶 *S*ma，纯度高，活性好，各项条件下活性皆不低于商品化产品。

关键词： *Serratia marcescens* 非特异性核酸内切酶 分泌表达 无机盐培养基 酶活

作者简介：徐一帆（1984—），女，硕士研究生

****通讯作者**，刘明秋，女，副教授，E-mail：liumq@fudan.edu.cn

前言

*S*ma 的典型代表是来源于 *Serratia marcescens*[1] 的非特异性核酸内切酶[2] 。它能够降解各种形式 DNA 和 RNA，对单链、双链、线状、环状和超螺旋形式的 DNA 和 RNA 的磷酸二酯键均具有很高的活性，产生 5'-磷酸核苷酸或 5'-磷酸寡核苷酸，且对核酸没有序列要求。无论是在实验研究，还是工业用途，*Sma* 都是目前唯一同时有效去除 DNA 和 RNA 的酶。

它的优点是能够降解各种形式的 DNA 和 RNA 却不会降解蛋白。可以应用于①降低细菌裂解时核酸释放产生的粘度，并且适用于任何裂解方式包括溶菌酶，冻融，高压；蛋白纯化。②在大规模的层析纯化时，避免由于大量的核酸吸附在层析介质上降低蛋白的有效载量从而降低纯化得率。③在 ELISA，二维电泳和免疫印迹分析中，提高分辨率和回收率。④消除重组蛋白、疫苗等生物制品的外源性核酸残留：美国 FDA 制定的治疗用重组生物制品生产准则规定，成品的外源性核酸残留量应不超过 100pg/剂。因此 *S*ma 具有广阔的应用前景。

此类酶在市场中的商品化产品名为 Benzonase。目前，该酶主要是在大肠杆菌中表达的，由于该酶具有信号肽，生成的核酸酶一般有少量被分泌到胞外，还有一些在周质和以无活性的包涵体形式存在于胞内。有些工艺采用将包涵体增溶和复性，虽然得到了具有活性的酶，但是比活不高。考虑到该酶的产量低，工艺繁琐，价格昂贵，限制了其应用范围，需要开发新的工艺来提高其产量及性能。本文主要从提高目的蛋白表达量，提高目的蛋白表达纯度两方面入手。并在改变工艺的同时保证该酶的活性不受影响。

1. 材料与方法

1.1 材料

表达载体 pET28a-ompA 为本实验室构建保存，为在 pET28a 载体融合了信号肽 ompA；大肠杆菌（*E. coli*） BL21(DE3)、DH5α和 K12 菌株均为本实验室保存。PCR 扩增引物由 Invitrogen 公司合成。Taq 酶、限制性内切核酸酶、DNA 连接试剂盒、DNA Marker 均购自宝生物工程（大连）有限公司；PCR 产物纯化试剂盒，质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自上海 Sangon 公司；Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自 ThermoFisher Scientific 公司；离子交换层析柱购自 GE healthcare

公司。其他生化试剂：琼脂糖，丙烯酰胺，甲叉丙烯酰胺，十二烷基磺酸钠，过硫酸铵，四甲基乙二胺，卡那霉素，鱼精 DNA 等均为 Amresco 进口分装。高氯酸，乙醇，乙酸购自上海国药集团。

1.2 方法

1.2.1. 重组质粒 ompA-Sma 的构建

根据 Sma 的编码基因序列，由 Invitrogen 公司合成两条引物

Sma-Fp：5'GGCGCATATGGCTAGCGCTGATAC3'（划线处为 *Nde*I 酶切位点）

Sma-Rp：5'GGCTAAGCTTAACGGTCTACTACAAG 3' （划线处为 *Hin*dIII 酶切位点）

PCR 反应条件为：95ºC 预变性 5min、95ºC 变性 30s、58ºC 退火 30s、72ºC 延伸 1min、30 个循环后 72ºC 延伸 10min。将从大肠杆菌 K12 中扩增出的 *S*ma 基因的 PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳回收。按照 PCR 产物纯化试剂盒说明手册对 PCR 产物进行纯化后，用内切酶 *Nde*I 和 *Hin*dIII 对 pET28a-ompA 质粒和纯化产物进行双酶切，酶切反应体系置于 37ºC 恒温水浴中反应 4h。酶切产物用 2%琼脂糖凝胶电泳，切胶回收 pET28a-ompA 和 *S*ma 的目的片段，T4 连接酶于 20ºC 恒温反应 4h。将连接产物转化至已制备好的 DH5α感受态细胞中，然后将菌液涂于含 Kan（终浓度 50μg/ml）的 LB 平板上，37ºC 恒温箱内倒置培养 12~16h。挑取单个菌落至含 Kan 的 LB 培养基试管中，37ºC，180rpm/min 过夜培养。按照前述 PCR 条件对菌液进行鉴定，并将鉴定为阳性的重组质粒送 Invitrogen 公司测序鉴定。

1.2.2. *S*ma 的表达条件筛选

构建成功的质粒 pET28a-ompA-Sma 转化至大肠杆菌 BL21（DE3）感受态细胞中，然后将菌液涂于含 Kan（终浓度 50μg/ml）的 LB 平板上，37ºC 恒温箱内倒置培养 12~16h。挑取单个菌落至含 Kan 的 5ml LB 培养基试管中，37ºC，180rpm/min 过夜活化。次日按比例将菌液转接到 100ml 含 Kan 的 LB 培养液锥形瓶中，37ºC，180rpm/min 培养至 OD_{600}≈0.4 时，降低温度至 25 ºC 后加入 IPTG（终浓度 0.1mM）进行诱导。继续培养 4h 后离心收集菌体，菌体称重记录。同时，另取一管过夜培养的活化菌液 5ml，3000rpm 离心 5min 后弃上清。菌体用 5ml M9 培养液轻柔混悬清洗后，3000rpm 离心 5min 后弃上清。按比例将清洗后

菌液转接到100ml含Kan的M9培养液锥形瓶中。同上述LB培养液条件培养诱导，最后收集菌体并称重。

1.2.3. *Sma*的提取

将LB和M9培养后的菌体分别在25mM Tris-HCl，500mM sucrose，1mM EDTA，pH8.0的缓冲液重悬至OD_{600}≈5，冰浴30min，14000rpm离心5min。沉淀用同体积的25mM Tris-HCl，1mM EDTA，pH8.0的缓冲液重悬，冰浴30min，18000rpm离心10min。上清即为含目的蛋白粗提物的溶液。取不同培养基表达前后菌体及提取后上清样品跑SDS-PAGE电泳，比较诱导表达量及可溶提取量。

1.2.4. *Sma*粗提蛋白的活性定义

将待测底物鱼精DNA溶解于50mM Tris，2mM $MgCl_2$，0.1mg/ml BSA，pH8.0的缓冲液，鱼精DNA终浓度为1μg/μl。反应总体系为：*Sma*粗提蛋白溶液12.5μl，含鱼精DNA（1μg/μl）的缓冲液250μl。空白体系为：25mM Tris-Hcl，1mMEDTA，pH8.0的缓冲液12.5μl，含鱼精DNA（1μg/μl）的缓冲液250μl。将反应管和空白管在37度中水浴，分别间隔15min，30min，45min，60min取样50μl并加入50μl高氯酸（4%）。将此样品在冰中放置30min后14000rpm离心6min。取离心后上清测A_{260}。代入公式U/μl=△A_{260}×39375/t计算。将4次计算后的值取平均，即为*Sma*粗提蛋白的活性（U/μl）。

1.2.5. *Sma*蛋白的纯化和保存

通过表达，可溶及活性的综合比较，挑选较佳培养基条件下的蛋白粗提物在25mM Tris, 20mM NaCl，pH8.0的缓冲液中透析过夜。将HiTrap DEAE FF柱与HiTrap CM FF柱串联，用25mM Tris, 20mM NaCl，pH8.0缓冲液平衡层析柱。缓慢上样后，再用平衡缓冲液洗柱至平衡。之后，用25mM Tris, 1M NaCl，pH8.0缓冲液洗柱至平衡。用20mM醋酸钠，20mM NaCl，pH5.6缓冲液平衡Resource S柱。将上一步过柱后流穿液用醋酸调至pH5.6后上Resource S柱。上样后用平衡缓冲液洗柱。含20mM NaCl至100mM NaCl的20mM 醋酸钠，pH5.6的缓冲液线性梯度洗脱。最后用20mM醋酸钠，500mM NaCl，pH5.6缓冲液洗脱。取各上样及洗脱组分制电泳样，SDS-PAGE电泳分析结果及纯度。

收集纯度大于95%的目的蛋白洗脱组分在100mM Tris, 40mM NaCl，4mM $MgCl_2$，pH8.0缓冲液中透析过夜。超滤浓缩蛋白至0.6mg/ml，加入等体积100%

甘油混合均匀，至-20 ºC 保存。

1.2.6. 成品 *Sma* 蛋白的活性定义和活性检测

取 1.6μl *Sma* 用 50mM Tris, 2mM $MgCl_2$， 0.1mg/ml BSA, pH8.0 缓冲液稀释至 10ml。再取 200μl 稀释后 *Sma* 用上述缓冲液稀释至 1ml。其余操作同前“*Sma* 粗提蛋白的活性定义”。

将待测底物 pUC19 用 50mM Tris，2mM $MgCl_2$，0.1mg/ml BSA，pH8.0 的缓冲液稀释到 100ng/μl。将上述定义活性后的 *Sma* 粗提蛋白稀释至 1U/μl，0.1U/μl，0.01U/μl，0.001U/μl；采用同样的方法稀释商品化酶至 1U/μl。将 3μl 酶溶液与 150μl pUC19 混合，37 度水浴反应。分别间隔 5min，15min，30min 取样 10μl，加入 6μl loading buffer 终止反应。跑 2%琼脂糖凝胶电泳，比较底物消化的量。

1.2.7. *Sma* 酶活性能测试反应

缓冲液：50mM Tris，2mM $MgCl_2$，0.1mg/ml BSA，pH8.0。待测底物鱼精 DNA 溶解于反应缓冲液中，终浓度 1μg/μl。*Sma* 用反应缓冲液稀释 31250 倍（稀释方法同上述活性定义）。每个反应体系加入 250μl 鱼精 DNA 和 12.5μl *Sma*，阴性对照中以反应缓冲液替代 *Sma*。阳性对照中以商品化酶替代 *Sma*。将三组反应管和空白管分别在 4 度，25 度，37 度中水浴反应 60min 取样 50μl 并加入 50μl 高氯酸（4%）。将此样品在冰中放置 30min 后 14000rpm 离心 6min。取离心后上清测 A_{260}。检测温度对 *Sma* 酶活影响并比较商品化酶与 *Sma* 在同等温度条件下性能优劣。

2. 结果

2.1. 重组质粒ompA-*Sma*的构建鉴定

构建的重组质粒pET28a-ompA-Sma经PCR鉴定，大小一致，约810bp。将筛选的阳性质粒送上海英骏测序，证实插入序列的正确。

2.2. Sma的表达条件筛选

重组质粒pET28a-ompA-Sma经IPTG诱导后及渗透休克提取总蛋白质。SDS-PAGE结果显示，M9培养基与LB培养基（图1）诱导后在27KDa左右皆出现明显条带，与预计的蛋白条带大小一致。仅从诱导后的目的蛋白条带对比，*Sma* 蛋白表达量差异不大。但从总蛋白量条带对比来看，LB培养基诱导后杂蛋白量

相比于M9培养基诱导后多。从渗透休克提取后的上清和沉淀来看，LB培养基中目的蛋白在上清和沉淀中分布较均匀，M9培养基中目的蛋白主要在上清中。综上所述，M9培养基表达的*Sma*蛋白相比于LB培养基可溶性更好且纯度更高。

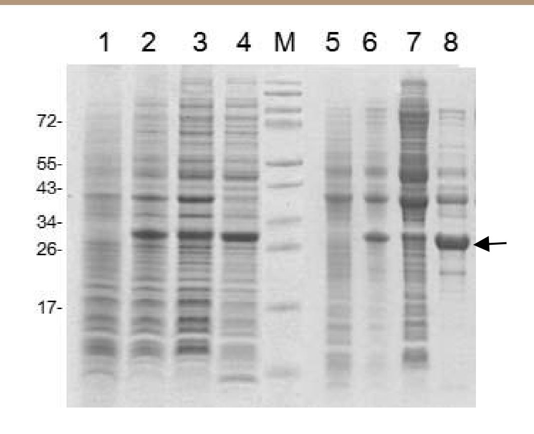


图1 *Sma*在不同培养基中表达及裂解后总蛋白质SDS-PAGE检测

Fig.1 SDS-PAGE analysis of *Sma* total protein expressed and lysised from different medias

1: *Sma*在LB培养基中诱导前; 2: *Sma*在LB培养基中诱导后; 3: LB培养裂解后蛋白沉淀; 4: LB培养裂解后蛋白上清; M: 分子量标准; 5: *Sma*在M9培养基中诱导前; 6: *Sma*在M9培养基中诱导后; 7: M9培养裂解后蛋白沉淀; 8: M9培养裂解后蛋白上清

1: *Sma* before induced in LB; 2: *Sma* after induced in LB; 3: Pellet after osmotic shock in LB; 4: Supernatant after osmotic shock in LB; M: Marker; 5: *Sma* before induced in M9; 6: *Sma* after induced in M9; 7: Pellet after osmotic shock in M9; 8: Supernatant after osmotic shock in M9

2.3. Sma粗提蛋白的活性定义

根据1.2.4中公式U/μl=$\triangle A_{260}\times39375/t$，检测经LB培养得到的*Sma*粗提蛋白活性为63U/μl，经M9培养得到的*Sma*粗提蛋白活性为118U/μl。表明，经M9培养得到的*Sma*粗提蛋白活性更高。综合2.2及2.3结果，挑选M9培养基条件下的蛋白粗提物进行下一步纯化。

2.4. Sma蛋白的纯化

各层析柱纯化的蛋白样品及洗脱组分经SDS-PAGE电泳分析结果显示，第一次HiTrap DEAE FF柱与HiTrap CM FF柱串联纯化后，大量杂蛋白被层析柱吸附，

*S*ma蛋白存在于流穿液中。流穿液经第二次Resource S柱纯化后，*S*ma蛋白在NaCl浓度20mM至100mM线性梯度中洗脱，Bradford法测浓度后计算蛋白产量为7mg/L，纯度大于95%（图2）。

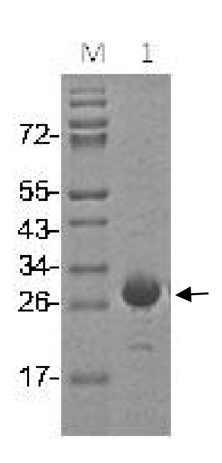


图2 *S*ma离子交换柱纯化后蛋白质SDS-PAGE检测

Fig.2 SDS-PAGE analysis of *S*ma purified by ion-exchange column

M: 分子量标准; 1:离子交换纯化后Sma

M: marker; 1: *S*ma purified by ion-exchange column

2.5. 成品Sma蛋白的活性定义和活性检测

根据1.2.4中公式U/μl=△A_{260}×39375/t，得到的*S*ma蛋白活性为273U/μl，高于商品化产品的250U/μl。

根据1.2.8中检测方法检测成品*S*ma蛋白活性，2%琼脂糖凝胶电泳分析结果显示，3U的*S*ma可在5分钟内将15μg底物消化完全（图3）。0.3U的*S*ma可在15分钟内将15μg底物消化完全（图4）。*S*ma的活性不低于商品化产品。

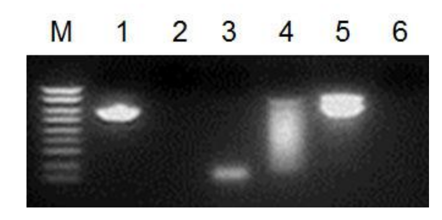


图3 不同单位活性*S*ma在37度下与15μg底物反应5分钟后琼脂糖凝胶检测

Fig.3 Agarose analysis of different units *S*ma digest with 15μg substrate for 5 minutes

M : 1Kb DNA 分子量标准; 1:阴性对照; 2: 3U *S*ma; 3: 0.3U *S*ma; 4: 0.03U *S*ma 5: 0.003U *S*ma; 6: 3U Benzonase

M : 1Kb DNA ladder; 1:Negative control; 2: 3U *S*ma; 3: 0.3U *S*ma; 4: 0.03U *S*ma 5: 0.003U *S*ma; 6: 3U Benzonase

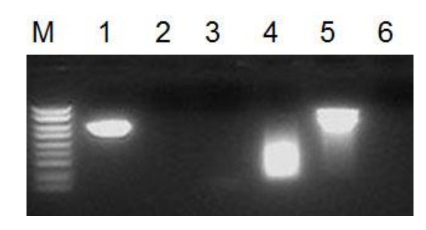


图4 不同单位活性*S*ma在37度下与15μg底物反应15分钟后琼脂糖凝胶检测

Fig.4 Agarose analysis of different units *S*ma digest with 15μg substrate for 15 minutes

M : 1Kb DNA 分子量标准; 1:阴性对照; 2: 3U *S*ma; 3: 0.3U *S*ma; 4: 0.03U *S*ma 5: 0.003U *S*ma; 6: 0.3U Benzonase

M:1Kb DNA ladder;1:Negative control; 2: 3U*S*ma; 3: 0.3U *S*ma; 4: 0.03U *S*ma 5: 0.003U *S*ma; 6: 0.3U Benzonase

2. 6. Sma酶活性能测试

根据1. 2. 9*S*ma酶活性能测试，收集不同温度条件下酶活反应终止后A_{260}数据（图5）显示，酶在4度时，几乎没有活性，随着温度的升高，酶的活性逐渐上升。相同温度条件下，*S*ma的活性高于Benzonase。

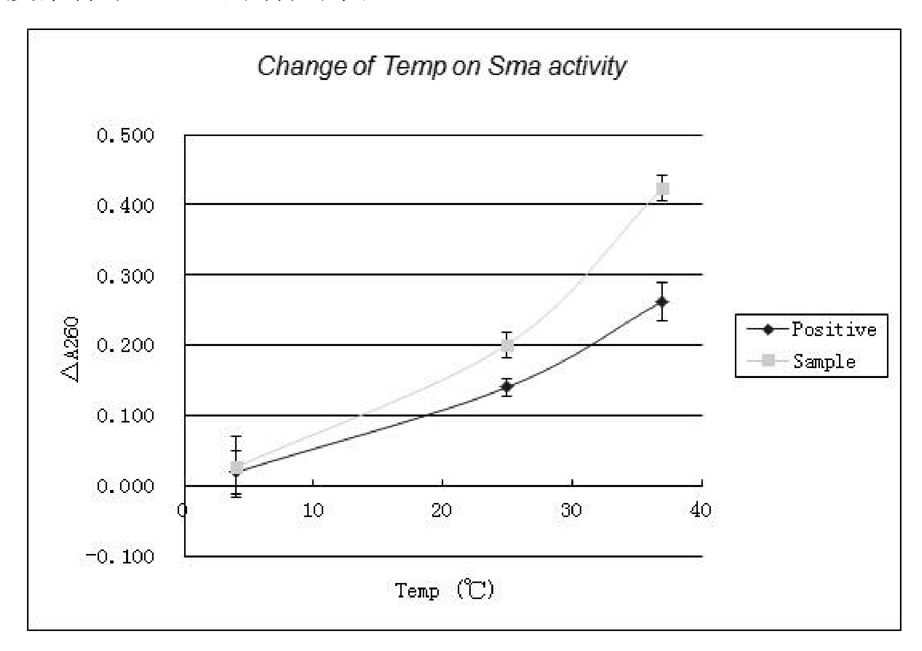


图5 不同温度下*S*ma酶活性能

Fig.5 Change of temperature on *S*ma activity

3. 讨论与分析

本研究拟解决的主要问题是提高目的蛋白表达量，提高目的蛋白纯度。同时

在改变工艺的同时保证该酶的活性不受影响。

第一，周质空间的蛋白[3]含量低, 蛋白酶活性要比胞质中低, 使所表达的蛋白能避免胞内降解从而稳定地存在，有利于目标蛋白的浓缩。对周质分泌型菌体采用定向释放技术，使细胞外膜破损而不损害细胞内膜，定向释放周质空间的蛋白质[4]，从而使下游纯化简单有效，使来自宿主菌的污染减小到最低。将信号肽 ompA 与目的蛋白融合构建至表达载体[5]，大肠杆菌有内膜和外膜组成的双层膜结构, 在内膜和外膜之间的区域即所谓的周质（ periplasmic space）[6]。利用大肠杆菌系统，在外源基因的 N 端融合一段细菌蛋白的疏水信号肽，可将目的蛋白运送到周质空间，经信号肽酶将信号肽切除后，即可获得与天然蛋白一致的构象(不含 N 端多余的甲硫氨酸)[7]。E. *coli* 的细胞周质中含有一系列的酶，并提供了一个氧化的环境，这些都有利于二硫键的正确形成[8]，促进蛋白的正确折叠，使有活性蛋白的产量得到提高。

第二，采用极限培养基[9-10]即仅含碳水化合物（提供碳源和能量）和提供氮，磷，微量元素的无机盐培养基进行蛋白表达，一方面由于表达时提供的养分有限，蛋白缓慢表达不易形成包涵体，提高了蛋白的可溶性；另一方面，用此类培养基表达的蛋白中的杂蛋白含量更少。

本研究从这两方面提高了蛋白的纯度，配合有效的纯化方案，获得了>95%纯度的目的蛋白。

参考文献

[1]Barbara Yannelli, R N, Paul E S, Burke A C, et al. Serratia marcescens. Clinical Microbiology Newsletter, 1987, 9 (20): 157-160

[2] Dake E, Hofmann T J, Mcintire S, et al. Purification and properties of the major nuclease from mitochondria of Saccharomyces cerevisiae. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(16): 7691-7702

[3] Klint J K, Senff S, Saez N J, et al. Production of recombinant disulfide-rich venom peptides for structural and functional analysis via expression in the periplasm of E. coli. PLoS ONE, 2013 8(5): e63865

[4] Rastgar J F, Karkhane A A, Yakhchali B, et al. A simplified purification procedure for recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor

from periplasmic space of Escherichia coli. Journal of Chromatograph B, 2007, 856(1): 214-221

[5] Cole S T, Sonntag I, Henning U, et al. Cloning and expression in Escherichia coli K-12 of the genes for major outer membrane protein OmpA from Shigella dysenteriae, Enterobacter aerogenes, and Serratia marcescens. Journal of Bacteriology, 1982, 149 (1): 145-150

[6] Takayama Y, Akutsu H. Expression in periplasmic space of Shewanella oneidensis. Protein Expression and Purification, 2007, 56(1): 80-84

[7] Smith S, Mahon V, Lambert M, et al. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. Fems Microbiology Letters, 2010, 273(1): 1-11

[8] 李振国，徐明波, 牛罡，等。在大肠杆菌周质表达重组蛋白的研究进展。药物生物技术，2011, 18 (1) : 73-76

Li Z G, Xu M B, Niu G. et al. Progress of recombinant protein expressed in E.coli periplasmic space. Pharmaceutical Biotechnology, 2011, 18 (1): 73-76

[9] GAO D W, WEN X H , et al . Comparative study on using carbon or nitrogen limited medium to culture white rot fungi for reactive brilliant red dye K-2BP decolotization under non-sterile conditions. Science in China Series B: Chemistry, 2007,50 (5) :718-724

[10]GAO D W, WEN X H, Qian Y, et al. Effect of nitrogen concentration in culture mediums on growth and enzyme production of Phanerochaete chrysosporium. Journal of Environmental Sciences, 2005, 17 (2): 190-193

Expression and Purification Procedure of Nonspecific Endonuclease *S*ma and Its Performance Study

Xu Yi-fan, Liu Ming-qiu*

(School of life sciences, Fudan University，Shanghai 200438, China)

Abstract

[Objective] To express nonspecific endonuclease *Serratia marcescens* (*S*ma), gain the high purity expressed product, and determine its activity. [Methods] *S*ma fragment was produced by PCR. The constructed recombinant plasmid pET28a-ompA-Sma was transformed into *E. coli* BL21(DE3) to express soluble and high-yielding *S*ma by optimizing different medium. Target protein was extracted by osmotic shock, purified by ion exchange. Compared *S*ma with commercial product by activity test of different temperature. [Results] PCR and sequencing proved that recombinant plasmid was constructed correctly. The recombinants *S*ma at an expression level of 7 mg/L, gained 7300KU *S*ma per liter media, super-reached a purity of 95% and a specific activity of 273U/μl (commercial product is 250U/μl) after purification. [Conclusion] *S*ma was successfully expressed. The purified *S*ma showed a high purity and activity. Under various conditions, the activity is not lower than that of commercial products.

Key words: *Serratia marcescens*; nonspecific endonuclease; secretory expression; minimal medium; activity